

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI  
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

013468200

WPI Acc No: 2000-640143/200062

XRAM Acc No: C00-192727

XRPX Acc No: N00-474806

Use of a combination of a polyanion, a filter and a polyanion-binding  
adsorbent to remove enveloped viruses from blood, plasma or serum

Patent Assignee: BRAUN MELSUNGEN AG B (BINT )

Inventor: MUELLER G A; SCHETTLER V

Number of Countries: 026 Number of Patents: 003

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
EP 1044696	A2	20001018	EP 2000107784	A	20000411	200062	B
DE 19916352	A1	20001019	DE 1016352	A	19990412	200062	
JP 2000334037	A	20001205	JP 2000111324	A	20000412	200102	

Priority Applications (No Type Date): DE 1016352 A 19990412

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	--------	----------	--------------

EP 1044696	A2	G	8 A61M-001/34	
------------	----	---	---------------	--

Designated States (Regional): AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT

LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI

DE 19916352	A1	A61M-001/34
-------------	----	-------------

JP 2000334037	A	6 A61M-001/34
---------------	---	---------------

Abstract (Basic): EP 1044696 A2

NOVELTY - A combination of a polyanion, a filter and a  
polyanion-binding adsorbent is used to remove enveloped viruses from  
blood, plasma or serum.

USE - The combination is especially useful for removing enveloped  
viruses, e.g. hepatitis C virus (HCV), from extracorporeal blood using  
an apheresis system.

pp; 8 DwgNo 0/2

Title Terms: COMBINATION; POLYANION; FILTER; POLYANION; BIND; ADSORB;  
REMOVE; ENVELOP; VIRUS; BLOOD; PLASMA; SERUM

Derwent Class: B04; D16; P34

International Patent Class (Main): A61M-001/34

International Patent Class (Additional): A61K-035/14; A61M-001/16;

A61M-001/36; B01D-015/04; B01D-015/08; B01D-037/00; B01D-061/14;

B01D-061/24; C12S-003/22; C12R-001-93

File Segment: CPI; EngPI

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号  
特開2000-334037  
(P2000-334037A)

(43)公開日 平成12年12月5日(2000.12.5)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード*(参考)
A 6 1 M 1/34	5 0 0	A 6 1 M 1/34	5 0 0
1/36	5 4 5	1/36	5 4 5
B 0 1 D 15/04		B 0 1 D 15/04	
15/08		15/08	
61/14	5 0 0	61/14	5 0 0
審査請求 未請求 請求項の数19 O L (全 6 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000-111324(P2000-111324)

(22)出願日 平成12年4月12日(2000.4.12)

(31)優先権主張番号 1 9 9 1 6 3 5 2 : 9

(32)優先日 平成11年4月12日(1999.4.12)

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(71)出願人 500170445

ベー. ブラウン メルサンゲン アーゲー  
ドイツ連邦共和国 34212 メルサンゲン、  
カール-ブラウン-シュトラッセ 1

(72)発明者 フォルカー シェットラー

ドイツ連邦共和国 37085 ゲッティンゲ  
ン、フリードリヒ-ジェナー-シュトラ  
ッセ 9

(72)発明者 ゲルハルト エー. ミューラー

ドイツ連邦共和国 72076 トゥービンゲ  
ン、ハセルヴェク 9

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54)【発明の名称】 血液、血漿または血清からのエンベロープ保有ウイルスの除去

(57)【要約】

【課題】 血液、血漿または血清からのエンベロープ保有ウイルスの除去。

【解決手段】 血液、血漿または血清からエンベロープ保有ウイルスを除去するための、少なくとも1種のポリアニオン、1種の沈殿物用のフィルターおよび1種のポリアニオン結合性吸着物質を含む組成物の使用。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 血液、血漿または血清からエンベロープ保有ウイルスを除去するための、少なくとも 1 種のポリアニオン、1 種の沈殿物用のフィルターおよび 1 種のポリアニオン結合性吸着物質を含む組成物の使用。

【請求項 2】 組成物がポリアニオンとしてヘパリンまたはヘパリン誘導体を含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】 組成物がポリアニオン結合性吸着物質としてイオン交換体物質を含む、請求項 1 または 2 に記載の使用。

【請求項 4】 組成物が孔径  $2\mu\text{m}$  未満、好ましくは  $0.4\sim 0.8\mu\text{m}$  の沈殿物用のフィルターを含む、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 5】 エンベロープ保有ウイルスとして C 型肝炎ウイルスを除去する、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 6】 除去を体外血液循環中に実施する、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 7】 pH が  $5.05\sim 5.25$  に設定されており、該 pH において少なくともエンベロープ保有ウイルスとポリアニオンとの複合体が沈殿し、その後沈殿物用のフィルターによってこの複合体を除去する、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 8】 ウイルスの除去後、過剰のポリアニオンをポリアニオン結合性吸着剤によって除去する、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 9】 続いて透析をさらに実施する、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】 ポリアニオンを生理学的に寛容性のバッファーに溶解し、血液、血漿または血清に対するポリアニオン/バッファー溶液の比率を容積で  $1:5$  および  $5:1$  の間にする、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 11】 組成物がさらに少なくとも 1 種のウイルス抑制剤、好ましくはインターフェロンおよび/またはリバビリンを含む、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 12】 体外血液循環中に患者の血液、血漿または血清からエンベロープ保有ウイルスを除去するための組成物を製造するための、ポリアニオン、沈殿物用のフィルターおよびポリアニオン結合性吸着物質の使用。

【請求項 13】 ポリアニオンとしてヘパリンまたはヘパリン誘導体を使用する、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】 ポリアニオン結合性吸着物質としてイオン交換体物質を使用する、請求項 12 または 13 に記載の使用。

【請求項 15】 孔径が  $2\mu\text{m}$  未満、好ましくは  $0.4\sim 0.8\mu\text{m}$  の沈殿物用のフィルターを使用する、請求項 12～14 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 16】 pH が  $5.05\sim 5.25$  の間に設定されてお

2

り、該 pH において少なくともエンベロープ保有ウイルスとポリアニオンとの複合体が沈殿し、その後沈殿物用のフィルターによってこの複合体を除去する、請求項 12～15 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 17】 ウイルスの除去後、過剰のポリアニオンをポリアニオン結合性吸着物質によって除去する、請求項 12～16 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 18】 続いて透析をさらに実施する、請求項 17 に記載の使用。

【請求項 19】 組成物を製造するため、さらに少なくとも 1 種のウイルス抑制剤、好ましくはインターフェロンまたはリバビリンを使用する、請求項 12～18 のいずれか 1 項に記載の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、血液、血漿または血清からエンベロープ保有ウイルスを除去するための、少なくとも 1 種のポリアニオン、1 種の沈殿物用のフィルターおよび 1 種のポリアニオン結合性吸着物質を含む組成物の使用、ならびに体外血液循環中に患者の血液、血漿または血清からエンベロープ保有ウイルスを除去するための組成物の製造における、ポリアニオン、沈殿物用のフィルターおよびポリアニオン結合性吸着物質の使用に関する。

## 【0002】

【従来の技術】ヒトのウイルス感染の治療は依然として困難であり、また免疫システムが多数のウイルスを適切にコントロールすることができるので、多くのウイルス感染は一般的には生命に関わる症状の発現には関係しないが、それでも非常に危険なウイルスが実際に存在し、感染した患者に生命を脅かす疾病をもたらす。抗ウイルス性化学治療剤が徐々に開発されてきたが、これは微生物に対して有効な物質の開発の場合よりもさらに困難であった。これは主として、ウイルスが細胞内寄生体であって、複製のために、感染した細胞の代謝経路への活発な関与を利用するという事実に基づいているものである。このことが、ウイルスを殺傷することができる物質の投与が常に宿主生物の細胞の損傷の危険と関係することの理由である。抗ウイルス活性を有する物質を開発または発見するために、長い間努力してきたが、現在、わずかな有効化合物が承認されているのみである。その上、これらの物質は非常に特殊なウイルスに対して限定された活性を有するのみである。こうしたウイルス抑制物質による治療は患者に対して相当程度の副作用を伴うことが多い。場合によっては、その副作用は生命に関わる症状をもたらすほどである。最後に、インターフェロンの外に、アシクロビル(aciclovir)若しくはイドクスウリジン(idoxuridine)などの複製阻害剤を含む抗ウイルス活性を有する物質、ならびにアマンタジンなどのウイルス包膜を破壊する物質による治療は高価であり、またすで

に上に記載したように、その活性および有用性には限界がある。

#### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】このように、例えばC型肝炎ウイルス（HCウイルス）またはHIウイルスなどのウイルスに感染した患者を治療する実現性を提供するための大きな必要性、すなわち目的が存在した。こうした治療の実現性は可能なかぎり十分寛容性で、そして使用において可能なかぎり安全であることを意図している。

#### 【0004】

【課題を解決するための手段】この目的は、本発明にしたがい、血液、血漿または血清からエンベロープ保有ウイルスを除去するための、少なくとも1種のポリアニオン、1種の沈殿物用のフィルターおよび1種のポリアニオン結合性吸着物質を含む組成物の使用によって、達成される。

【0005】本発明の範囲内において、驚くべきことに、特に血液からLDLコレステロールを除去するために以前から使用されてきた方法の一つが患者の血液、血漿または血清からエンベロープ保有ウイルスを除去するためにも著しく好適であることが見出された。このLDLコレステロールを除去する方法とはSeidelおよびWielandによって開発されたいわゆるH.E.L.P.法（Seidel and Wieland(1982) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20, 684-685; Wieland and Seidel(1983) J. Lipid. Res. 24, 904-909）であり、これは血液、血清または血漿からのLDLの除去に関してすでに多数の知的所有権の対象になっている。本発明に従うエンベロープ保有ウイルスを除去するための方法は原則としてこの記載されたH.E.L.P.法に類似させて、類似の装置で実施することができる。例えば欧州特許第0 074 610号、欧州特許第0 166325号、欧州特許第0 174 478号および欧州特許第0 180 720号に記載されたH.E.L.P.法は以下の原理に基づいている：血液を患者の腕のシャントから採取し、通常血漿フィルターによって血漿を細胞から分離する。この方法で取得された血漿は沈殿チャンバーに入り、そこで酢酸ヘパリンバッファと混合され、LDLが架橋し、LDL-ヘパリン複合体として沈殿する。沈殿したLDL-ヘパリン複合体を沈殿物用のフィルターによって血漿から除去する。次に、LDLを含まない血漿/酢酸バッファ混合物をヘパリン吸着剤、好ましくはイオン交換体を通過させる。ここで過剰のヘパリンが除去され、通常これに続いて、生理学的血液pHおよび当初の容積に復元するため、希釈した血漿の重炭酸塩透析および限外ろ過が実施される。体外循環の最後に、このように処理した血漿を血漿フィルター中で除去した血液細胞と再び混合し、シャントの静脈部から全血を患者に送り戻す（Eisenhowerら、(1987) Clin. Wschr. 65, 161-168）。

【0006】原則として、記載された様相で、H.E.L.P.法を本発明の範囲内で使用することができるが、LDLの

除去のためにすでに記載され、または／および使用されている改変法をエンベロープ保有ウイルスの除去のために使用することも可能である。特に基本的なH.E.L.P.法に関する上記の特許における開示を本明細書中で参照し、この開示を本出願に組み入れる。

【0007】血液、血漿または血清からエンベロープ保有ウイルスを除去するための本発明に従う方法をH.E.L.P.法に類似させて体外アフエーシス法として実施することができる。これは患者から採取した血液を体外血液循環中に処理し、その後そのままその患者に送り戻すものである。

【0008】しかし、献血液についてエンベロープ保有ウイルスの除去を実施することも同様に考えられる。この場合、必要ならば更なる処理後、必要になるまで血液は血液バンクに保存される。この使用のためには、肝炎ウイルスなどのエンベロープ保有ウイルスがその血液から除去されることが同様にきわめて重要である。なぜならば、同種血液を受け取る人々は普通すでに衰弱しているので、ウイルスを含んでいる血液の投与は特に彼らにとって苛酷な影響があると考えられるからである。患者に直接戻されない血液、血漿または血清からウイルスを除去する場合、もちろん必ずしもアフエーシス装置を使用する必要はない。それよりも、血液の処理のために一般的に好適な環境中で作業し、同時にH.E.L.P.法の原理を利用することが可能である。H.E.L.P. LDL アフエーシス法の本発明に従う使用において、エンベロープ保有ウイルスを非常に効果的に除去することが可能であるので、献血液のエンベロープ保有ウイルスに関するほとんど完全な精製が可能である。処置後に血液を患者に直接戻すアフエーシス法においても、その後、罹患した患者に対しての非常に減少した感染力を示すことが可能である。医療の観点から、このH.E.L.P.法のみによって、罹患した患者のウイルスを含まない治療が可能である。この場合、H.E.L.P.法の多数回の使用が適宜必要なこともある。特定のウイルス病原体については、その他のタイプの免疫調節治療法がさらに必要な場合もある。これは特にHIV感染者について適用される。

【0009】H.E.L.P.法の図式による説明を図1に示す。この方法のそれぞれのステップが非常によくわかるが、本発明に従う使用をこの図に示されるステップおよび条件に限定する意図はない。しかし、図1は、原則として使用が可能であり、市販品も入手し得る B. Braun Melsungen AGのH.E.L.P.法を図解するものである。

【0010】本発明の範囲内においては、H.E.L.P.法にすでにあるように、ポリアニオンとしてヘパリンまたはヘパリン誘導体を使用するのが好ましい。また、原理としては、沈殿バッファ中でLDLまたは／およびエンベロープ保有ウイルスの沈殿をもたらす能力がある限り、本発明の範囲内でその他のポリアニオンを使用することが可能であるが、ヘパリンがH.E.L.P.法において特

5

に好適であることが実証されている。しかし、多大な成果があるヘパリン誘導体を使用することも完全に可能である。ここで用語、ヘパリン誘導体は本発明の範囲内ではヘパリン様物質をも包含する。このタイプの物質として、例えば加水分解したヘパリン、遊離アミノ基がアシル化されている加水分解ヘパリンが含まれるが、硫酸化グルコサミノグリカンおよびその他の硫酸化多糖類も使用が好ましいその他のポリアニオンである。

【0011】本発明の範囲内において、ポリアニオン、および特にヘパリンを沈殿バッファーに添加するが、使用するバッファーは生理学的に寛容性で、血液、血漿または血清に対するポリアニオン／バッファー溶液の比率は容積で1:5および5:1の間にある。pHを5.05~5.25に設定するのが特に有利である。このとき、ポリアニオンとエンベロープ保有ウイルスのと複合体の沈殿が特に効果的に生じるからである。この沈殿物を沈殿物用のフィルターから廃棄し、バッファーで希釈された形態の血液、血漿または血清で構成され、その上過剰のアニオンが含まれていると考えられるろ液をポリアニオン結合性吸着物質を通過させる。この間に、過剰のポリアニオンが除去され、そして本発明の好ましい実施形態においては、それに続いて透析を実施して、血液をさらに精製する。最後に、血液を当初の濃度にもどす。これは限外ろ過によって特に効果的に実施される。最後に、エンベロープ保有ウイルスが少なくとも実質的に除去された血液を生理学的pHに調整した後、患者に戻す。

【0012】説明してきた操作法は主として体外血液循環における患者の血液からのウイルスの特定の好ましい除去に対応する。献血された血液、血漿または血清からのウイルスの除去に際しては、エンベロープ保有ウイルスの除去に支障がない限り、適宜この操作法を改変することが可能である。これに関連して、診断方法およびその他の精製方法との組合せも可能である。

【0013】沈殿物用のフィルターは本発明においては、ポリアニオンとエンベロープ保有ウイルスのと複合体、ならびに場合によってはLDLなどのその他の物質が残留し、一方血液中に存在し、かつ必要な最低量の他の物質が取り除かれるような分離効力を有するものである。孔径が2 $\mu$ m未満の沈殿物用のフィルターを使用するのが好ましく、孔径が0.4~0.8 $\mu$ mのものが特に好ましい。これについては、フィルターとして膜フィルターを使用するのが好ましい。しかし、ポリアニオンとエンベロープ保有ウイルスのと複合体が残留し、一方血液中に存在するその他の物質が可能な限り完全に通過するという条件に同様に合致するならば、フィルター作用を有するその他のシステムを使用することも、本発明の範囲内として同様に可能である。

【0014】沈殿物用のフィルターの代わりに吸着剤を使用する、すなわち吸着クロマトグラフィーによって物質を除去する、血液からのLDLなどの、望ましくない物

6

質の体外除去のための従来の方法と比較すると、本発明の方法は顕著な利点を示す。

【0015】1種類の吸着剤には常に特有の分子のみが結合し、非結合物質は損傷されないで吸着剤を通過する。しかし、吸着物質の性質によっては、本来吸着されるはずの分子の幾分かが溶出液中に見られる。完全な除去はほとんど不可能である。なぜならば、吸着剤は遮蔽(blockage)を避けるために、十分大きなチャネルおよび孔径が必要であるが、除去すべき分子が吸着物質中の特異的結合部位の1つに付着しない場合は、これらもまた、もちろんこのチャネルを通して通過するからである。

【0016】しかし、本発明に従う方法は別のタイプのウイルスの除去を利用する。エンベロープ保有ウイルスはその包膜上にLDLを吸着する能力を有する。本発明に従う方法の範囲内において、この方法に関してウイルスとヘパリン分子が強力に架橋することが可能なのは、このLDLとの相互作用を介するものと推定される。ヘパリンとエンベロープ保有ウイルスとの巨大な凝集塊が形成され、これらの凝集塊が沈殿物用のフィルター上に残留し、これらが別の層、1種の脂質膜を形成することになって、これが次に、沈殿物用のフィルターを通過する可能性があったさらに小さな集塊を保持する。それにもかかわらず、本発明に従う方法の範囲内において、沈殿物用のフィルター上および形成した集塊脂質層上のヘパリンと複合体化したエンベロープ保有ウイルスの非常に効果的な残留があっても、血液中で患者にとって重要な生物分子の保持は、血液が戻された後でもこれによる患者に対する副作用が予測されないような様相でのみ達成されることが発見された。

【0017】ポリアニオン結合性吸着物質は本発明の範囲内では好ましくはアニオン結合性イオン交換体物質である。過剰のポリアニオンを除去することができるその他の物質も、血液中に存在する物質の望ましくない保持を示さないならば、同様に本発明の範囲内で好適である。

【0018】感染患者の血流中には完全なエンベロープ保有ウイルスとともに非エンベロープ保有ウイルス分子もしくはウイルスRNAが共存するか、または感染細胞から新しいウイルスが分泌されることがあるので、本発明の特定の好ましい実施形態において、ウイルス抑制剤を組成物に添加し、また処理した血液を戻した後、患者にこれを投与する。

【0019】ウイルス抑制剤の投与は、上に詳述したように、何らかの程度に、化学療法剤での患者の治療に対する不利益を必然的に伴う可能性があるが、本発明の範囲内においては、大部分のエンベロープ保有ウイルスを除去するので、投与量を著しく少量に維持することが可能であり、またはるかに良好な効果が達成される。これによって、治療の時間を大いに減少させることが可能と

7

なる。不完全ウイルスのウイルスRNAが事実上感染性であるかどうかは、明確にはまだわかっていない。しかし、H.E.L.P.法による治療と同時のウイルス抑制剤の投与は、実質的に完全なエンベロープ保有ウイルスの除去の上に、免疫システムがウイルスの部分破壊するかまたは新規に分泌されたウイルスへの効果的な攻撃を開始することができるような、この治療の可能な最大の成果を確実にする。好適なウイルス抑制剤は当業者に知られているが、本発明の範囲内では、インターフェロンまたはリバビリン（1-β-D-リボフラノシール-1,2,4-トリアゾール-3-カルボキシアミド）が好ましく使用される。

【0020】本発明はさらに、体外血液循環中に患者の血液、血漿または血清からエンベロープ保有ウイルスを除去するための組成物を製造するための、ポリアニオン、沈殿物用のフィルターおよびポリアニオン結合性吸着物質の使用に関する。血液、血漿または血清からエンベロープ保有ウイルスを除去するための組成物の本発明に従う使用についてすでに上に記載した好ましい実施形態を同様の方法で体外血液循環中のエンベロープ保有ウイルスを除去するための組成物の本発明に従う製造に適用することができる。この点に関して、上記の記載が同様に適用される。

【0021】本発明に従う使用によって、患者にとって負担にならない方法での患者の血液からのエンベロープ保有ウイルスの、場合によっては事実上完全な除去をもたらすことが可能である。慢性ウイルス疾患がある患者は、長期間のウイルスキャリアであることが多く、したがって例えばC型肝炎ウイルスなどを他の人々に感染させることがあるが、この患者の治療は少なくともこのグループの人々への感染性の多大な減少をもたらす。また、急性疾患を有する感染患者の治療も、特に同様に負担のない様相で可能であり、それによってこれらの急性罹患患者には身体にとって新たな負担となるような薬剤の投与が必要でないか、または少なくとも顕著に減少される。本発明に従って使用するアフエレーシスをさらに

8

連続して数回使用することができ、それによって宿主細胞から新たに分泌されるウイルスを除去することができ、したがって細胞の感染サイクルおよび新たに形成されたウイルス血液中への分泌が阻止される。

【0022】また、慢性感染者である献血者に由来する危険がある献血液の処置において、エンベロープ保有ウイルス、特にC型肝炎ウイルスに関して、事実としては完全にではないにしても、実質的に除去することが可能である。

10 【0023】上にすでに記載したように、本発明に基づく機構はまだ完全にはわかっていないが、ウイルスの包膜とLDLとの結合がこれに部分的に関与し、おそらくウイルスおよびヘパリンの両方のLDLへの結合を介して、この複合体が沈殿すると推測される。この理論的作用機構の図式による説明を図2に示す。

【0024】しかし、この作用の仮定的機構によって、本発明をどんな意味においても限定するつもりはない。以下の実施例は本発明をさらに説明することを目的としている。

20 【0025】

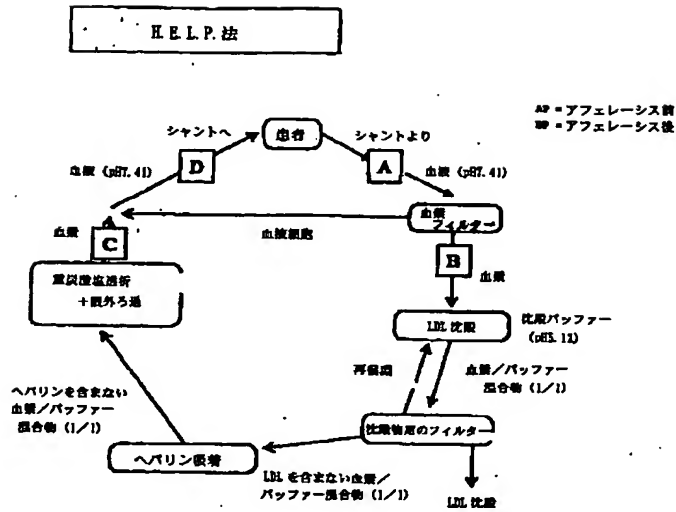
【実施例】（実施例1）B.Braun Melsungen AGからのH.E.L.P.アフエレーシスシステム（使い捨て器具：注文番号706 1102；治療用装置：注文番号706 2001；1994カタログ）を使用し、指示書にしたがって、患者を処置した。処置の前にこの患者から血液を2回採取し、HCV RNA PCRにおいて、HCVについて陽性であることがわかった。HCVは処置の当日、アフエレーシスの直前にも検出された。アフエレーシス処置後、HCVは、PCRによって、明らかに比率が小さくなって検出された。3日間隔で処置を繰り返した。処置の最後には、HCVは実質的に検出し得なかった。

【図面の簡単な説明】

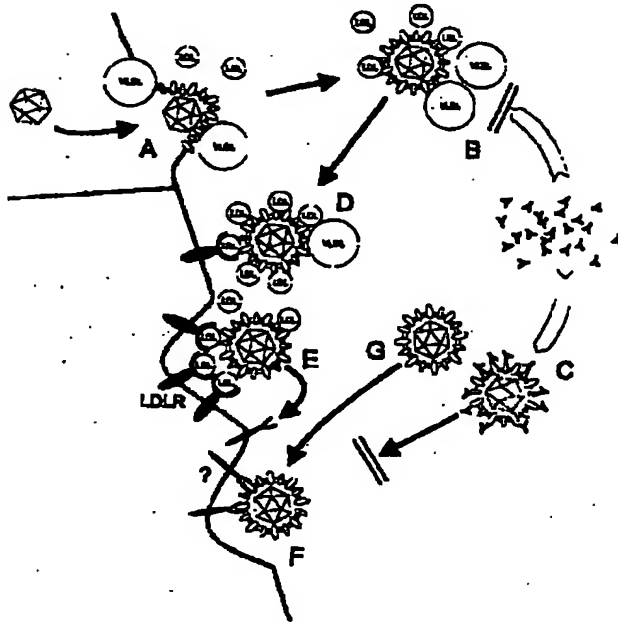
【図1】H.E.L.P.法の説明図である。

【図2】本発明に基づく理論的作用機構の説明図である。

【図 1】



【圖 2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>  
B 0 1 D 61/24  
// A 6 1 K 35/14

識別記号

F I	
B O 1 D	61/24
A 6 1 K	35/14

テーマコード' (参考)

$$\mathbf{z}$$